

Zusammenfassung der Dissertation
„Massenspektrometrie-basierte Hochdurchsatz-Protein-Liganden
Bindungsassays“
von Kerstin Reinecke

Die meisten Zielproteine („Targets“) für die heutige Pharmaforschung sind regulatorische Proteine, deren Konzentration in der Zelle so gering ist, dass sie in einem artifiziellen System (beispielsweise in Bakterien) synthetisiert („exprimiert“) werden müssen. Für die vorliegende Arbeit wurde als Zielprotein die Protein-Phosphatase CDC25A in E. coli exprimiert, weil in der Abteilung Waldmann am Institut für molekulare Physiologie eine Substanzbibliothek von etwa 4000 potentiellen Phosphatase-Inhibitoren für die Etablierung eines Screening-Verfahrens zur Verfügung steht. Durch die Expressierung dieses Systems wurde es möglich, in diesem Arbeitskreis einen konventionellen, photometrischen Assay hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung von Verbindungen auf die Cdc25a-Phosphatase aufzubauen.

Dieses Protein stand im Mittelpunkt der Bindungsassays und wurde neben anderen Proteinen auf unterschiedliche Arten immobilisiert, zum einen an EPOXY-Beads für einen Affinitätsassay im Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Elektrospraymassenspektrometrie-System (HPLC-ESI-MS-System). Zum anderen durch mehrere Techniken an unterschiedliche Oberflächen, um das Protein in einem Matrix-assistiertem-Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)-basierten Bindungstest einzusetzen. Die bisherigen Methoden zeigten die gebundenen Substanzen nur indirekt, z.B. über Fluoreszenz [1, 2] oder Radioaktivität.

Massenspektrometrie ist schon über einen längeren Zeitraum hinweg eine wesentliche Methode für die Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen nach der Synthese im Hochdurchsatzmaßstab (High Throughput Screening, HTS). [3,4, 5, 6]

Die Immobilisierung der Proteine im MALDI-Assay erfolgte zum einen auf kommerziell erwerblichen vergoldeten MALDI-TOF-Probentellern der Firma Bioperseptive mit DTSP-SAM und auf Blattgold mit MPA-SAM und anschließender Aktivierung durch EDC und NHS.

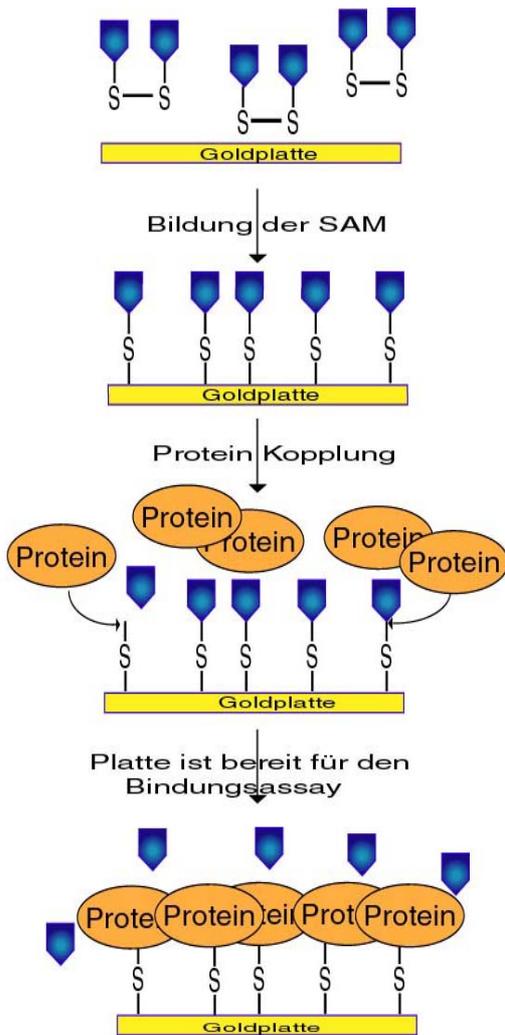


Abbildung 1: Prinzip der Kopplung von Protein an Goldoberflächen. Nach Ausbildung der selbstorganisierenden einlagigen Schicht („self-assembled monolayer“, SAM) wird das Protein mit der Aminogruppe seines N-Terminus über die reaktive Gruppe des kovalent gebundenen Moleküls an die Goldoberfläche immobilisiert.

Hier wurden die Proteine Streptavidin, Farnesyltransferase, Ras und Cdc25a mit ihren spezifischen Bindern getestet. Zum anderen wurden in der MALDI-Massenspektrometrie ungewöhnliche Oberflächen wie Laserdruckerfolie und Nitrocellulosemembran eingesetzt. Auf die Laserdruckerfolie wurden Streptavidin und Cdc25a über Poly-L-Lysin und Quervernetzung mit Glutaraldehyd gebunden. Streptavidin und Cdc25a wurden auf der Nitrocellulosemembran durch Absorption immobilisiert.

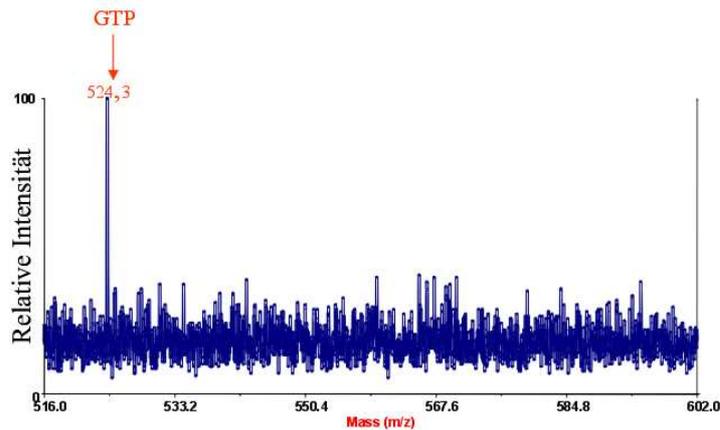


Abbildung 2: MALDI-Massenspektrum von GTP aus auf der Goldoberfläche immobilisierten V12Ras (50pmol) (ohne weiteren Zusatz von GTP), nach Denaturieren mit 1 µl Isopropanol und Messung in 1 µl Matrix (10 mg/ml THAP + 25 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril): 524,3: GTP+H⁺

MALDI-Massenspektrometrie wäre im Prinzip die Methode der Wahl, da sie rasch und kostengünstig durchzuführen ist. Allerdings waren die Probleme mit der unspezifischen Bindung von schlecht wasserlöslichen Substanzen an die Assay-Oberflächen gravierend. Die Messungen mussten einzeln hinsichtlich spezifischer und unspezifischer Bindung hin ausgewertet werden, was einen hohen zeitlichen Aufwand bedeutete. Gerade den zeitlichen Aufwand für die Einzelmessung und deren Auswertung gilt es in einem High-Troughput-System zu minimieren. Zudem waren bei keiner der unterschiedlichen Immobilisierungstechniken die Ergebnisse nach dem Bindungsassay zuverlässig reproduzierbar. Daher kann ein MALDI-basierter Bindungstest kaum zu einem Routineeinsatz kommen. Erwartungen, die durch frühere Arbeiten [8, 7, 9, 13] geweckt wurden, diese Methode für das Screening verwenden zu können, wurden nicht bestätigt.

Die Immobilisierung an die EPOXY-Beads wurde erfolgreich überprüft durch SDS-PAGE der wieder abgelösten Proteine Ras und BSA. Experimente mit Guanylatkinase gebunden an die EPOXY-Beads zeigten eine Umwandlung von Substraten zu Produkten (GDP und ATP zu GTP und ADP). Die Guanylatkinase war demnach noch funktionstüchtig nach ihrer Modifizierung. Insgesamt konnte damit nachgewiesen werden, dass sich aktives Enzym in den Affinitätsäulen befand. Zur Elution von Bindern in dem ESI-MS-Bindungsassay wurden zwei Methoden eingesetzt: Die Denaturierung des Proteins, um starke Binder, wie Streptavidin, zu lösen, und die Verdrängung des Binders durch andere Liganden oder Salze. Durch ESI-MS wird der Ligand im Eluat detektiert.

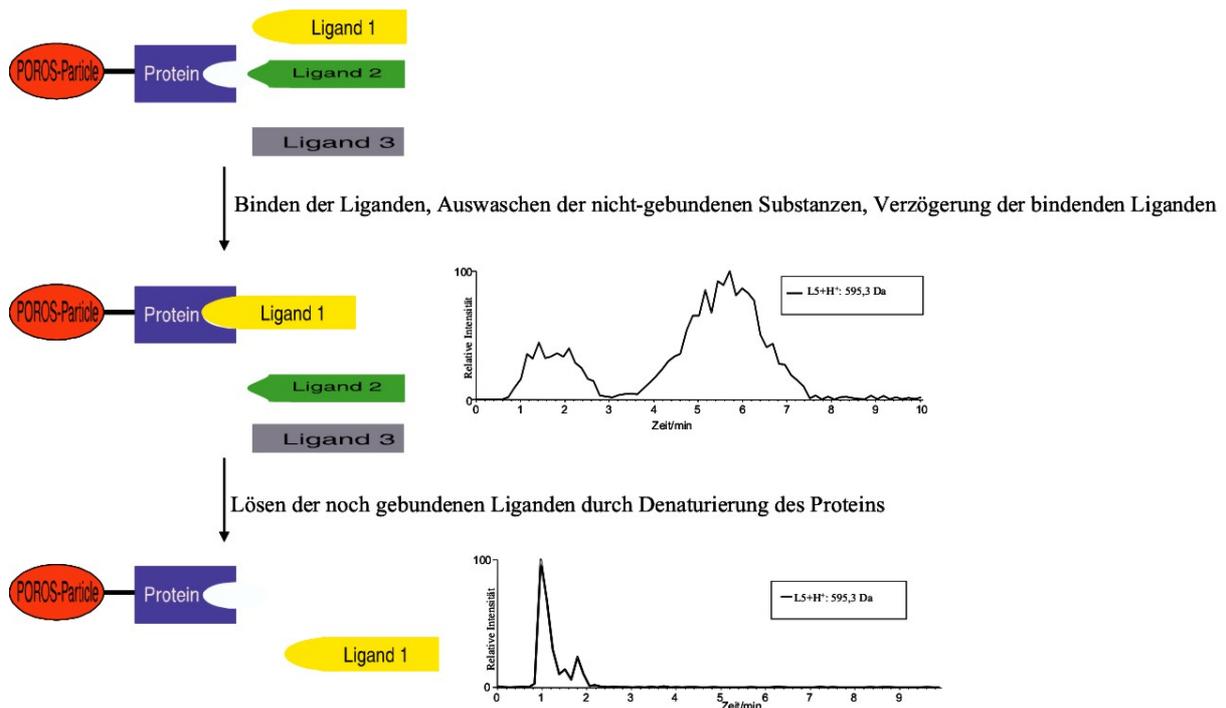


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs des Assays, dem immobilisierten Protein werden verschiedene mögliche Liganden in einer Mischung zum Binden angeboten (obere Abbildung). Nur ein für das Protein affiner Ligand bindet das immobilisierte Protein. Der Ligand wird durch Denaturierung des Proteins wieder freigesetzt.

Im Einzelnen wurden mit den ersten beiden Methoden des ESI-Assays folgende Proteine untersucht: Zunächst Streptavidin mit seinem Bindungspartner Biotin als positives System zum Aufbau des Assays. Dann folgten Farnesyltransferase mit möglichen Farnesyltransferase-Inhibitoren. Bei den weiteren Proteinen handelte es sich um GMPKinasase und Ras, deren Bindungspartner die Nukleotide und auch GTPase-Aktivatoren sind. Hier konnten bei den Bindungsstudien von Nukleotiden und Ras bzw. Guanylatkinase Erfolge erzielt werden. Im Fall des Ras geschah die Elution der Nukleotide mit Salzen, im Fall der Guanylatkinase durch Verdrängung mit unterschiedlichen Nukleotiden. Die Farnesyltransferase mit ihren Inhibitoren stellte das erste problematische System dar, in dem sich unspezifische Bindung der Inhibitoren an einer BSA-POROS-Säule zeigte. Einige GTPase-Aktivatoren hingegen zeigten Bindung an die Ras-POROS-Säule und ließen sich durch Lösungsmittel eluieren.

Eine dritte Variante verzichtete auf das gezielte Eluieren der Liganden durch Denaturierung oder Verdrängung, die frontale Affinitätschromatographie (frontal affinity chromatography, FAC) gekoppelt an das ESI-MS, wie sie von Schriemer et al. durchgeführt wurde. [10, 11, 12] In den Arbeiten von Schriemer wurde das Protein nach seiner Biotinylierung an eine Avidin-Affinitätssäule gebunden und dem immobilisierten Protein Substanzen im Durchfluss zur Bindung angeboten. Die Verzögerung gebundener Liganden gegenüber nicht-gebundenen Substanzen im Durchfluss wurde durch Detektion mit ESI-MS bestimmt. Neu in der

vorliegenden Arbeit ist die Durchführung einer FAC ohne das ständige Infundieren von Substanz. Diese Form des HPLC-MS-Bindungsassays wurde mit der Phosphatase Cdc25a und ihren möglichen Inhibitoren durchgeführt. Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten erfolgte unter Aufgabe eines bestimmten Volumens auf die Affinitätssäule. Dadurch konnte Material und Zeit gespart werden. Allerdings war die unspezifische Bindung einiger Substanzen, nachgewiesen an einer mit BSA-POROS beladenen Säule, so groß, dass diese Aussagen über die Bindungskonstanten für schlecht lösliche Substanzen unzuverlässig sind.

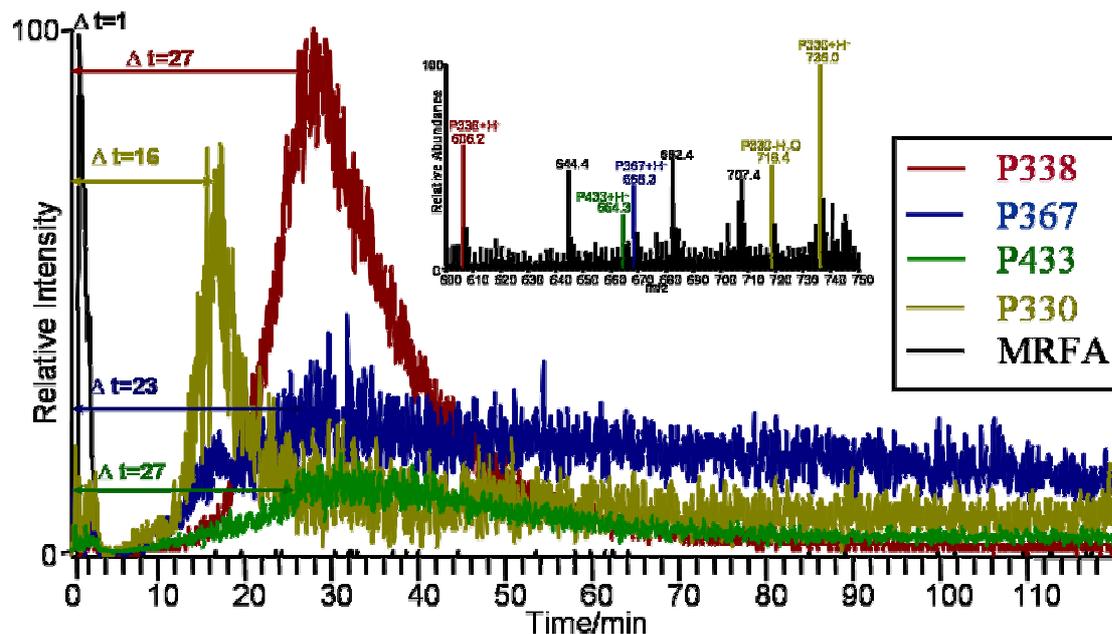


Abbildung 4: Massenchromatogramme der Verbindungen MRFA, P330, P338, P367 und P433 im Durchfluss einer unter vierfachem Druck gepackten Cdc25a-POROS-Säule; 100 μ l Gemisch von je 100 μ M Substanz; Flussgeschwindigkeit: 50 μ l/min; Laufmittel: 10 μ M Ammoniumacetat in Wasser.

Eine weitere Variante eines massenspektrometrie-basierten Bindungsassays stellte der Gelfiltrationsassay mit direkt-gekoppelter (Speed Screen) oder anschließender Analyse der Fraktionen (S. Sauer) in der ESI-MS dar. Im Prinzip sollte durch den Gelfiltrationsassay von S. Sauer eine Quantifizierung der gebundenen bzw. nicht-gebundenen Substanzen möglich sein. Dies gelang jedoch nicht zuverlässig. ESI-Massenspektrometrie war zur Quantifizierung hier nicht geeignet, da sich nicht nur die Kalibration als schwierig und ungenau herausstellte, sondern weil viele der getesteten Substanzen schlecht wasserlöslich sind und somit als Spuren im System verblieben, welche eine zuverlässige Quantisierung verhinderten. So konnten keine sinnvollen Schlüsse aus den Messungen gezogen werden. Der zweite Typ von Gelfiltrationsassay, Speed Screen, sollte lediglich eine Aussage darüber treffen, ob ein Binder oder Nicht-Binder vorliegt. Es ergaben sich jedoch nur wenig verwertbare Ergebnisse, die dann auch noch im Widerspruch zu den Analysen in der FAC und den IC₅₀-Werten der Substanzen standen.

Es zeigte sich auch im ESI-MS-Assay, dass die meisten synthetisierten Verbindungen unserer Substanzbibliothek an recht unterschiedliche Proteine mit sehr ähnlicher Affinität binden. Dieses Phänomen wurde bereits als promiske Inhibitoren beschrieben [14]. Dabei zeigte sich die generelle Grenze der Methode: Man kann bei Bindungsstudien nicht a priori zwischen spezifisch und unspezifisch gebundenen Substanzen unterscheiden. Die Unterscheidung wird entweder durch Vergleichsmessungen oder durch Kompetitionsbindungsstudien getroffen. Das ist von der Detektionsmethode (Massenspektrometrie, Radioaktivität, Fluoreszenz...) weitgehend unabhängig. Abhängig ist die unspezifische Bindung an Proteine dagegen von der Löslichkeit der Liganden in wässrigen Phasen.

Im Verlauf dieser Arbeit kristallisierte sich immer mehr heraus, dass ein Bindungsassay auf Basis von massenspektrometrischer Detektion der Liganden sich nicht für heterogene Substanzbibliotheken eignet. Die unterschiedlichen Bindungsassays, deren Detektionsprinzip auf MALDI-MS oder ESI-MS beruhte, lieferten teils widersprüchliche, teils durch unspezifische Bindung wertlose Ergebnisse.

Daher ist zu überlegen, wie sinnvoll der Einsatz solcher High-Troughput-Systeme für Protein-Liganden-Bindungen überhaupt ist. Drei verschiedene Affinitätbindungstests, welche die Binder mittels HPLC-MS detektierten sollten, brachten zumeist wenig zuverlässige Ergebnisse. Dort, wo ein aussagekräftiges Ergebnis in allen Tests erzielt werden konnte, widersprachen sich FAC/MS, Sauer-Assay und Speed Screen. Besser wäre es, den Einfluss der Substanzen auf die Enzymaktivität zu messen. Durch Pipettierroboter wird ermöglicht, was zu Beginn der Arbeit noch sehr aufwendig schien. Viele einzelne Substanzen können nun hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung in kurzem Zeitraum getestet werden. Auch die Kosten für die Enzyme halten sich in einem gewissen Rahmen, wenn sie nicht kommerziell erworben werden müssen, sondern in der Arbeitsgruppe hergestellt werden. Auch neue Zellassays ermöglichen ein viel breiteres Spektrum der Aktivitätsbestimmung der Substanzen und sollten weiter ausgebaut werden.

Literatur

- [1] Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, Eisenstein S, Rosen B, Lau AY, Walter JC, LaBaer J.: Self-assembling protein microarrays. *Science* 2004 Jul 2; 305(5680): 86-90
- [2] Ramachandran N, Hainsworth E, Demirkan G, LaBaer J.: On-chip protein synthesis for making microarrays, *Methods Mol Biol.* 2006; 328:1-14.
- [3] Gish L.G. und Vachet R.W.: The basics of mass spectrometry in the twenty-first century (2003); *Nature Rev. Drug Disc.* 2; 140-150
- [4] Kassel D.B.: Combinatorial Chemistry and Mass Spectrometry in the 21st Century Drug Discovery Laboratory (2001); *Chem. Rev.* 101, 255-267

- [5] Triolo A., Altamura M., Cardinali F., Sisto A. and Maggi C.A.: Mass spectrometry and combinatorial chemistry: a short outline (2001); *J. Mass Spectrom.* 36, 1249-1259
- [6] Shin Y.G. and Breemen R.B.v.: Analysis and screening of combinatorial libraries using mass spectrometry (2001); *Biopharm. Drug Dispos.* 22, 353-372
- [7] Bundy J. und Fenselau C: Lectin-based affinity capture for MALDI-MS analysis of bacteria (1999); *Anal. Chem.* 71, 1460-1463
- [8] Brockman A.H. und Orlando R.: Probe-immobilized affinity chromatography/mass spectrometry (1995); *Anal. Chem.* 67, 4581-4585
- [9] Bundy J.L. und Fenselau C.: Lectin and carbohydrate affinity capture surfaces for mass spectrometric analysis of microorganisms (2001); *Anal. Chem.* 73, 751-757
- [10] Zhang B., Palic M.M., Schriemer D.C., Alvarez-Manilla G.A., Pierce M. und Hindsgaul O.: Frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry for screening mixtures of enzyme inhibitors (2001); *Anal. Biochem.* 299, 173-182
- [11] Schriemer D.C., Bundle D.R., Li L. und Hindsgaul O.: Micro-scale frontal affinity chromatography with mass spectrometric detection: a new method for the screening of compound libraries (1998); *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 3383-3387
- [12] Zhang B., Palic M.M., Schriemer D.C., Alvarez-Manilla G., Pierce M. Und Hindsgaul O.: Frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry for screening mixtures of enzyme inhibitors (2001); *Anal. Biochem.* 299, 173-182
- [13] Brockman A.H. und Orlando R.: New immobilization chemistry for probe affinity mass spectrometry. (1996) 10 (13), 1688-1692
- [14] McGovern S.L., Caselli E., Grigorieff N. und Shoichet B.K.: A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening (2002); 45, 1712-1722